

# 小菜蛾气味受体蛋白 PlxyOr83b 基因的克隆及表达

李 珣, 刘晶晶, 龚 亮, 陈 永, 钟国华\*

(华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642)

**摘要:**【目的】克隆小菜蛾 *Plutella xylostella* 气味受体 Or83b 基因, 并进行原核表达, 为研究小菜蛾寄主选择行为的分子机理, 开发昆虫行为调节剂提供基础。【方法】提取小菜蛾的总 RNA, 反转录获得总 cDNA, 采用 RT-PCR 方法扩增目的基因, 将其克隆至 T 载体并测序, 然后将目的基因克隆到大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达载体 pET-32a (+) 中表达。经酶切、PCR 及测序鉴定正确后转化 BL21 (DE3) 菌株, 用 IPTG 诱导表达, 通过 SDS-PAGE, Western 印迹鉴定表达蛋白。【结果】获得了编码小菜蛾 Or83b 的 cDNA 序列, 该基因阅读框长 1 413 bp, 编码 471 个氨基酸, 预测的等电点为 7.19, 命名为 *PlxyOr83b* (GenBank 登录号为 GQ923610); 成功构建了 pET-*PlxyOr83b* 原核表达重组质粒, 目的基因获得高效表达, 其融合蛋白分子量为 32.0 kD, Western blot 检测结果进一步表明 *PlxyOr83b* 在大肠杆菌 DE3 中得到正确表达。【结论】成功克隆和表达了小菜蛾气味受体基因 *PlxyOr83b*, 该基因与其他昆虫 Or83b 基因基本一致。

**关键词:** 小菜蛾; 气味受体; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)05-0502-06

## Cloning and expression of odorant receptor gene *PlxyOr83b* from *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

LI Xun, LIU Jing-Jing, GONG Liang, CHEN Yong, ZHONG Guo-Hua\* (Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Aim】cDNA cloning and prokaryotic expression of *Plutella xylostella* odorant receptor Or83b were conducted in order to provide the basis for studying the molecular mechanism of selection behaviour between *P. xylostella* and host plants, and developing insect behavior regulators. 【Methods】cDNA encoding Or83b of *P. xylostella* was amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T vector for sequence analysis, the target gene was subcloned into pET-32a (+) for prokaryotic expression and then expressed under the induction of IPTG. The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western blot. 【Results】A gene encoding odorant receptor 83b from *P. xylostella* was cloned and named *PlxyOr83b* (GenBank accession number: GQ923610). The ORF of *PlxyOr83b* was 1 413 bp in length, encoding 471 amino acid residues, with the predicted pI of 7.19. Prokaryotic expression recombinant vector, pET-*PlxyOr83b*, was successfully constructed. SDS-PAGE assay showed that the target gene was highly expressed in BL21 (DE3) and the molecular weight of fusion protein was about 32.0 kD. Western blot indicated that *PlxyOr83b* was expressed correctly in DE3. 【Conclusion】*PlxyOr83b* was successfully cloned and expressed, and its sequence and protein structure are consistent with those of Or83b genes in *Drosophila* and other insects.

**Key words:** *Plutella xylostella*; odorant receptor; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

灵敏的嗅觉对于昆虫适应环境和种群繁衍具有重要的作用。气味受体 (odorant receptors) 是嗅觉系统的关键成分之一, 是了解昆虫化学信号分子识别机制的重要基础 (Jones *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009)。昆虫的气味受体基因分为两类, 一类是编码传统气味受体 (conventional

receptors) 的基因, 此类基因在不同昆虫间同源性较低 (Larsson *et al.*, 2004); 另一类是 *Or83b* 基因, 该类基因在不同昆虫间保守性非常高, 编码的受体统称为 Or83b 家族受体 (Or83b family receptors), 是一类非典型的气味受体 (atypical odorant receptors), 与传统气味受体不同, 此类受体可能不感受具体的

基金项目: 教育部霍英东教育基金会高等院校青年教师基金资助项目 (111027); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20094404110019)

作者简介: 李珣, 女, 1986 年生, 云南个旧人, 硕士研究生, 主要从事昆虫毒理学研究, E-mail: xun\_76776@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-09-28; 接受日期 Accepted: 2011-02-20

气味分子 (Dobritsa *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005; Ditzén *et al.*, 2008)。研究表明,在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等昆虫中,基因敲除后的 *Or83b* 突变体的嗅觉相关行为严重损伤,反之可恢复正常,这表明 *Or83b* 基因在昆虫嗅觉行为中具有普遍的作用,传统气味受体必需和非特异的气味受体 *Or83b* 共同表达构成复合体才有具有嗅觉功能,这是昆虫感受气味分子的必需条件 (Sakurai *et al.*, 2004; Larsson *et al.*, 2004)。从害虫防治角度看,可以针对具有普遍意义的 *Or83b*,研究其结构特征与分子感受机制,开发设计针对昆虫 *Or83b* 功能的行为调节剂 (Carey *et al.*, 2010)。到目前为止,已在多种昆虫中鉴定出 *Or83b* 家族受体基因,如黑腹果蝇的 *DOr83b* (Vosshall *et al.*, 2000)、地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 的 *CcOr83b* (Jones *et al.*, 2005)、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 的 *HsOr83b* (Jones *et al.*, 2005)、烟芽夜蛾的 *HvirR2* (Krieger *et al.*, 2002)、柞蚕 *Antheraea pernyi* 的 *AperR2*、家蚕 *Bombyx mori* 的 *BmorR2*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的 *AmorR2* (Krieger *et al.*, 2003)、冈比亚按蚊的 *AgOr7* (Pitts *et al.*, 2004)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的 *ORHarm* (王桂荣等, 2005)、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 *CqOr7* (Xia and Zwiebel, 2006) 等。

小菜蛾 *Plutella xyostella* 是一种世界性的蔬菜害虫,是我国最主要的蔬菜害虫之一,为害重,抗性高,造成巨大损失,迫切需要研究新的防治技术,其中,利用其行为学特性探索防治新方法,是近年来的研究热点。国内外尚未专门针对 *Or83b* 气味受体对小菜蛾进行防治研究,本文克隆了小菜蛾 *Or83b* 基因,成功构建其原核表达载体,并获得 *or83b* 重组蛋白,为今后研究小菜蛾寄主选择行为机理,开发相关行为调节剂提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要供试材料

供试昆虫小菜蛾 *P. xyostella*, 为田间采集后在本实验室饲养 20 代以上,饲养条件为温度 26℃,相对湿度 60%~80%,每天光照 12 h。取羽化后 2 d 内的成虫供试。实验前常规液氮冷冻, -80℃ 冰箱保存备用。

pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司, Top10, BL21

(DE3) 和表达质粒 pET-32a (+) 均为本实验室保存。

RNA 抽提 Trizol 试剂盒及反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司,各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, ExTaq DNA 聚合酶、核酸分子量标准、蛋白分子量标准及各种抗生素购自 TaKaRa 公司,凝胶回收试剂盒、Anti-His antibody,辣根过氧化物酶 HRP 标记的 Goat anti Mouse IgG,均为北京 Tiangen 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 小菜蛾触角 RNA 提取及 cDNA 第 1 链的合成

将在液氮中保存的小菜蛾触角取出加液氮捣碎后,加入 Trizol,按照 Invitrogen 公司的 Trizol Kit 说明书进行, 2 μg 总 RNA 模板和 20 ng oligo(dT) 1:8 混合,按 Invitrogen 公司 cDNA 合成 Kit 说明书合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中收录的 *Or83b* 基因序列设计如下引物,由上海 Invitrogen 公司合成:

Plxy-s: 5'-ATGATGAACAAAGTGAAAGCCAG-3';

Plxy-a: 5'-TTGCACCAACACCATGAAGTATG-3'。

反应体系 25 μL: cDNA 1 μL, 10 × Ex Taq buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL (2.5 mmol/L), ExTaq 0.5 μL, 正向引物和反向引物各 1 μL (20 μmol/L), 加水至 25 μL。反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 40 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

按产品说明书,从 1% 琼脂糖凝胶上回收 DNA 目的条带。回收产物连接于 pMD-18T 载体,连接产物转化后筛选阳性克隆,提取质粒并由上海 Invitrogen 公司完成 DNA 测序。

### 1.3 Or83b 基因同源性分析

利用 DNAMAN 软件将测序后获得的小菜蛾 *Or83b* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列,与其他已知的昆虫 *Or83b* 进行同源性比较。

### 1.4 PlxyOr83b 的原核表达

根据 *PlxyOr83b* 的 ORF 序列设计 1 对扩增引物,在上、下游引物 5' 端分别引入 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点,引物序列如下:

Plxy-*Hind* III: 5'-CCCAAGCTTATGATGAACAAAGTGAAGCC-3';

Plxy-*Xho* I: 5'-CCGCTCGAG TTGCACCAACACCATGAAGTAT-3'。

上游引物中有 *Hind* III 酶切位点,下游引物中有 *Xho* I 酶切位点,PCR 产物用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切,经凝胶回收纯化后,与经同样酶切的表达质粒 pET-32a (+) 连接,构建表达质粒 pET-Plxy

Or83b, 并转化入 BL21 (DE3) 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞中, 挑取酶切和测序鉴定正确的单克隆于 10 mL LB 培养基中 (含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素) 过夜培养, 次日以 1:100 稀释继续 37 $^{\circ}\text{C}$  培养, 当  $A_{600}$  达到 0.6~0.8 后, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达, 于 28 $^{\circ}\text{C}$  分别培养 2, 4, 6, 8 h, 培养物经高速离心后, 用 1 mL TE 重悬, 冰浴条件下超声波破碎。12 000 r/min 离心 10 min, 将各样品分为上清液和沉淀两份, 加入 5  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min, 取上清液进行 12% 的 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 检测重组蛋白的表达。

### 1.5 Western blot 分析

Western blot 分析采用一抗为 6  $\times$  His 融合蛋白的单抗 (Anti-His antibody)、二抗为辣根过氧化物酶 HRP 标记的 Goat anti Mouse IgG。转膜后, 带样品的硝酸纤维素 (NC) 膜用脱脂奶粉 (含 5% 脱脂奶粉的 1  $\times$  PBS, 2% Tween-20) 室温封闭 2 h, 以 PBST (含 2% Tween-20 的 1  $\times$  PBS) 洗涤 1~2 次。一抗经抗体孵育缓冲液 (含 5% BSA 的 1  $\times$  TBS, 2% Tween-20) 稀释至合适浓度后, 与 NC 膜室温反应 2 h (或 4 $^{\circ}\text{C}$  反应过夜), PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; HRP 酶标二抗经抗体孵育缓冲液稀释后, 与 NC 膜室温反应 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入 10 mL HRP 反应底物 DAB 溶液覆盖于 NC 膜上显色, 拍照保存图像。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PlxyOr83b* 的克隆与序列分析

由于 Or83b 受体在很多昆虫种类中高度保守, 根据 GenBank 中收录的 Or83b 基因序列设计引物, 以小菜蛾总 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 获得 1 400 bp 左右的片段 (图 1)。纯化该片段与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 蓝白斑筛选, 并测序。序列分析表明 (图 2), 获得小菜蛾 Or83b 气味受体基因 1 413 bp, 编码 471 个氨基酸, 预测等电点为 7.19。Signal P 分析推测氨基酸序列, 未发现信号肽。经 Blast 软件分析表明该片段与 GenBank 上已注册的其他昆虫的 Or83b 序列有显著的相似性, 其序列与黑腹果蝇、烟芽夜蛾、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 和草地螟 *Loxostege sticticalis* 等昆虫 Or83b 相似性均高于 80%, 表明昆虫 Or83b 家族受体成员的氨基酸序列高度保守 (图 3)。克隆

得到的小菜蛾 Or83b 命名为 *PlxyOr83*, 在 GenBank 中登录号为 GQ923610。运用 HMMTOP 软件预测 *PlxyOr83* 的跨膜区, 结果表明推导表达的蛋白质含 7 个跨膜区, 且 N 末端在膜内。

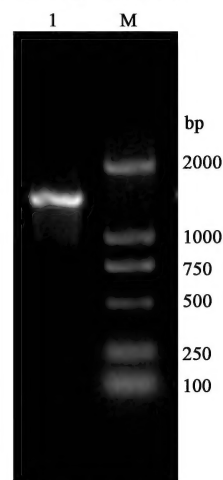


图 1 小菜蛾 Or83b 基因 (*PlxyOr83b*) cDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of cDNA of *Or83b* gene from *Plutella xylostella* (*PlxyOr83b*)

M: DNA 分子量标准 DNA Marker DL2000; 1: *PlxyOr83b* PCR 扩增产物 PCR product of *PlxyOr83b*.

### 2.2 原核表达重组质粒的 PCR 鉴定及双酶切鉴定

质粒 pET-*PlxyOr83b* 的 PCR 及双酶切鉴定结果分别如图 4 和图 5 所示, 片段大小为 1 400 bp 左右, 与预期一致。同时, 测序结果正确, 说明 *PlxyOr83b* 已正确插入 pET-32a (+) 中。

### 2.3 *PlxyOr83b* 在原核细胞中的融合表达和鉴定

将测序鉴定正确的表达质粒 pET-*PlxyOr83b* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 1.0 mmol/L IPTG 28 $^{\circ}\text{C}$  分别诱导培养 2, 4, 6 和 8 h, 对可溶性蛋白和不可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果表明, 在 28 $^{\circ}\text{C}$  培养温度下, 重组质粒经诱导表达后上清液和沉淀中都出现了 32.0 kD 左右的蛋白 (图 6, 7), 而未经诱导的重组质粒和空质粒中均无此条带, 表明目标蛋白 *PlxyOr83b* 得到表达, 同时说明目标蛋白以可溶性和不可溶性蛋白两种形式存在, 可溶性蛋白表达量较大 (图 6)。从保障可溶性蛋白充分表达, 降低不可溶性蛋白比例出发, 初步认为 pET-*PlxyOr83b* 原核表达的适宜条件为 28 $^{\circ}\text{C}$ , 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h。Western blot 分析结果表明, 与对照相比, pET-*PlxyOr83b* 在 32.0 kD 左右处出现 1 条特异性条带 (图 8), 说明外源基因 *PlxyOr83b* 在大肠杆菌 DE3 中得到正确表达, 验证了上述的结果与分析。

ATGATGACAAAGTGAAGAGCCGAGCGCTCGTGTCCGACTTGATGCCCAACATCAAGTTGATGCGAGATGGCGCGGCATTTTCTATTGAACATATCAGGAAG	100
M M N K K V C G G C G L V A S E D L G M P N I E K L M Q M A C G H F L F F N Y H E	
AAAAATGGCGGCATGTCCATGCTCTCTCGCGAGGATCTACGGCAGCGTGCACGCGTTCCCTCATGTGATCCACTACCTTGTGATAGCTGCTCAACATATGGCGCA	200
R N G C G G K A T S M M L L R K I Y A S V H A F L I V I H Y I L C M L L L N M A Q	
STACTCGGACGAGCTCAACGAGCTCACCGCCCAACACCATCAGCGTGCTGTTCTTCCGCCACACCGCTCATCAAGCTCTTGTACTTCCGCATCAATTCTTAAG	300
Y S D D V N E L T A N T I T V L T F F A H T F V I K L L Y F A I N S K	
AGCTTTTACAGAACCTCCGCAATGTGCAACAGCTCGAAGACAGCCCGCTTTCACGGAGTCGGACCGCCCTTACCAACAGCTCCGCGCTACCAACATCA	400
S F Y R T I L A V W N Q S N S H P L F T E S D A R C Y Y H Q L A L T K M	
CGAGGCTCATGTACTTTCATCTCGCCCGCTCACGTGCTCTGTGTCATCAGCTGGGTGACCTTTGACCTTTTTTCGGCGAGTCGGTCCGCTTCATCCCGGACAA	500
R R L L M Y F I C A A V T V L S V I E S W V T L T F F F G E S V K R F I P D K	
CGAGACCAACGAGAGCGCTCAGCGAGCGCCCGCCCCCGCTTGGCGCTGAAGGCTTGGTACCGCTTCGACCGCATAGCGCGCGGATGTACATTTTGCCCTTC	600
E T N E T L T E P A R L F L L A W Y T P F D A M G E C G C M Y T F A C T T	
GCTTATCAGGTATAGTGGCTGCTCTTTCGCCATGGCCATAGCGCAACCTTCATGGAGCGTGATGTTCTGCTGCTGCTGCTGTTTCGGCTCGCGAGCATGCGCTGCGC	700
A Y G Q V Y G L Y A M A I A N L M D V Y M F C S W L L F A C E Q L K	
ACCTGAAGCGCTCATGTAAGCCGCTGTATGGAGCTGAGCGGCTCTCTCGACACCTTACCGCGCGGAATACTGCTGAGCTTTCGCGCGCTAAATTCGCAGACAA	800
H L K A K I M K P L S A S L D T Y R P N T A R E L F R A N A D A D K	
AGAAAAAGTCCCGAGACCGCGGTAGACATGGACATCCGAGGCGATCTACTCCACTCAGCAGCGACTTCGGCATGACCGTCCGCGCGCGCGGGGGAGGCTGCAG	900
E K E Y V P D F V D M D I G K C G Y A S T G A H D G H D P G M T L R G C A G C G K L K	
AAC TT T G C G C G C G C A G C A G T C A A C C C C A A C G G C T C A C G C A A A S C A G G A G C T G T G C G C G C G C C C C A A G T A A G C	1000
N F G G Q Q Q V N N P N G L T Q K K G A M T L A R N S A I K Y W V E R H K	
ACCTGTGCTCGCTTTGCTTGACATATTGGACAGACATATCGGTCAGCGCTTGCATATCCACATGTTGGTGTGCGACTATCATTTTGACTTTGCTGCGCTATCA	1100
H V V X R L L V A S I G D T Y G G T A L L F F H M L V S T I C T L T L L L A Y X Q	
GGCAACTAAGATCGACGGCATGAATGTCTACGCTTTTCAGCACCATCGGCTACCTGAGCTACACGCTCGGCAAGTGTTCATTTTCTGCATTTTTCGGAAAC	1200
A T R I D I G L N V Y A F S T I G Y L S Y T L G Q V F H F C I F G	
CGACTTATTGAAGAGAGGCTCATCGGTGATGGAGCGCGGCTACTCTCTGCCAGTGGTACGACCGCTCCGAGGAGGCCAAGACCTTTCGTGCAGATCGTGTGCC	1300
R L I E E S S V V M E A A Y S C Q W Y D G S S E E A K T F V Q C I V C	
AGCAGTGGCAGGAAGGCCATGAGCATCTCGGGAGGCCAAGTTCTTACCGGTGTCCTGCGATTGTTTCGGCTTCGGTACTGGGTGCGGCTTGTGCACATATTCAT	1400
Q Q C Q K A M S I S G A R K F T T V S L D L F A S V L G A V V T Y F M	
GGTGTGCTGCA	1413

图2 *PlxyOr83b* 基因序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of *PlxyOr83b*

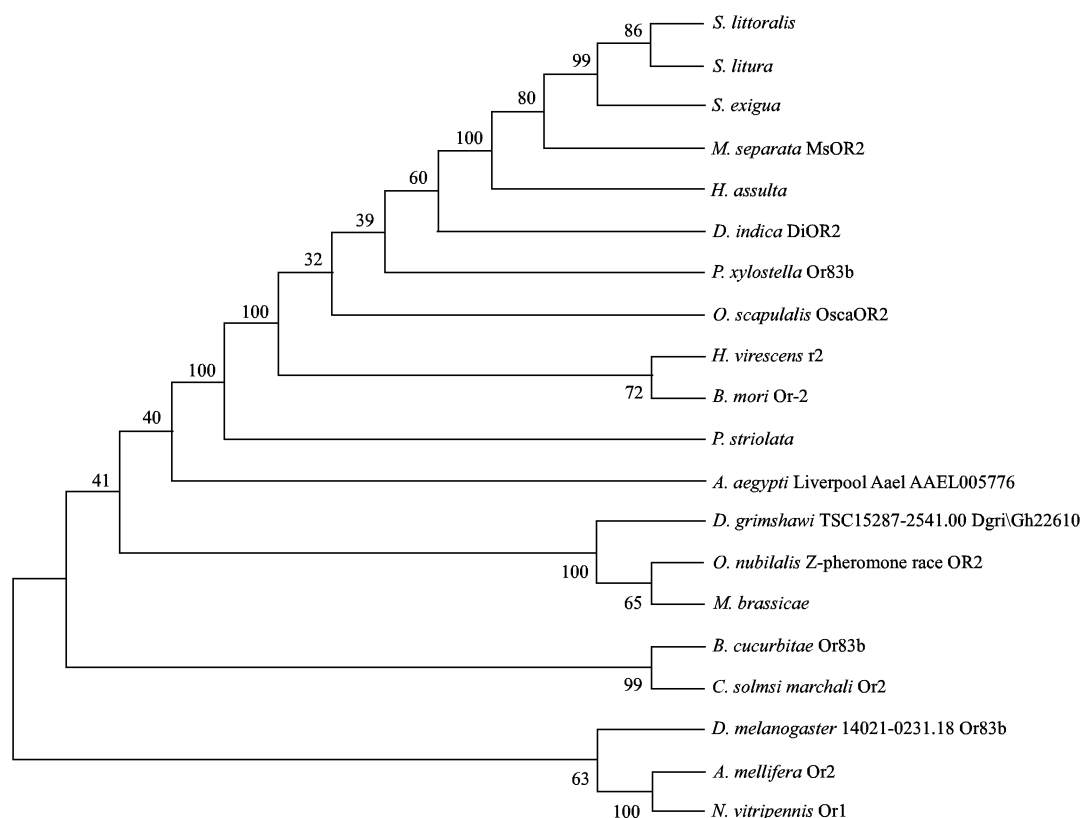


图3 昆虫 Or83b 氨基酸序列系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of amino acid sequence of insect Or83bs

*S. littoralis*: 海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*; *S. litura*: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*; *S. exigua*: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*; *M. separata*: 粘虫 *Mythimna separata*; *H. assulta*: 烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*; *D. indica*: 瓜绢螟 *Diaphania indica*; *P. xylostella*: 小菜蛾 *Plutella xylostella*; *O. scapularis*: 草螟蛾 *Ostrinia scapularis*; *H. virescens*: 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*; *B. mori*: 家蚕 *Bombyx mori*; *P. striolata*: 黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata*; *A. aegypti*: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; *D. grimshawi*: 果蝇 *Drosophila grimshawi*; *O. nubilalis*: 欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*; *M. brassicae*: 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*; *B. cucurbitae*: 瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*; *C. solmsi marchali*: 榕小峰 *Ceratosolen solmsi marchali*; *D. melanogaster*: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; *A. mellifera*: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*; *N. vitripennis*: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*.

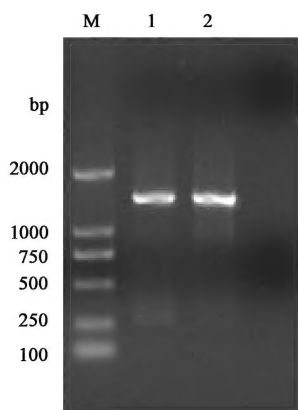


图4 表达载体 pET-*PlxyOr83b* 的 PCR 鉴定结果

Fig. 4 PCR identification of pET-*PlxyOr83b*

M: DNA 分子量标准 DNA Marker DL2000; 1, 2: pET-*PlxyOr83b* 扩增产物 PCR products of pET-*PlxyOr83b*.

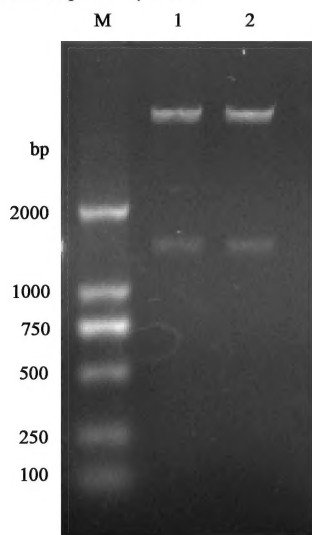


图5 表达载体 pET-*PlxyOr83b* 的双酶切鉴定结果

Fig. 5 Restriction endonuclease digestion of pET-*PlxyOr83b*

M: DNA 分子量标准 DNA Marker DL2000; 1, 2: pET-*PlxyOr83b*.

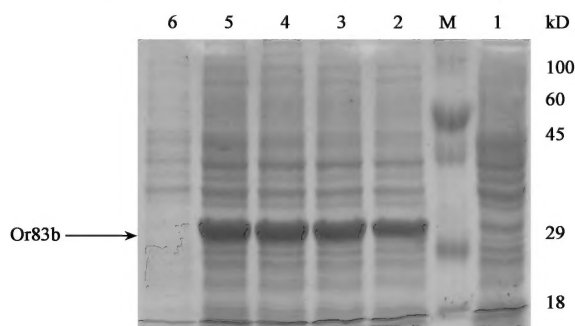


图6 pET-*PlxyOr83b* 可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of soluble protein of pET-*PlxyOr83b*  
M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 空质粒 PET-32a(+) 可溶性蛋白 Soluble protein of pET-32a(+); 2-5: 1.0 mmol/L 的 IPTG, 28℃ 下分别诱导培养 2, 4, 6, 8 h 可溶性蛋白的表达 Soluble protein of pET-*PlxyOr83b* induced by 1.0 mmol/L IPTG for 2, 4, 6 and 8 h, respectively; 6: pET-*Plxy* 未诱导继续培养 4 h 可溶性蛋白的表达 Soluble protein of pET-*PlxyOr83b* without induction by IPTG.

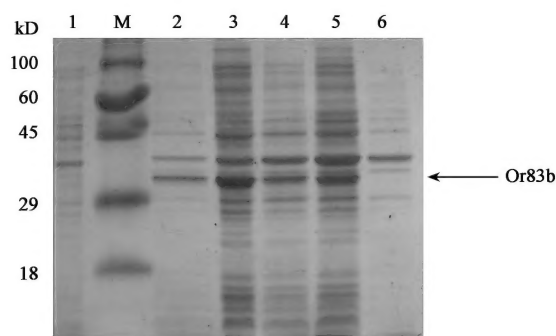


图7 pET-*PlxyOr83b* 不可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of insoluble protein of pET-*PlxyOr83b*  
M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 空质粒 pET-32a(+) 的不可溶性蛋白 Insoluble protein of pET-32a(+); 2-5: 1.0 mmol/L 的 IPTG, 28℃ 下分别诱导培养 2, 4, 6, 8 h 不可溶性蛋白的表达 Insoluble protein of pET-*PlxyOr83b* induced by 1.0 mmol/L IPTG for 2, 4, 6 and 8 h, respectively; 6: pET-*Plxy* 未诱导继续培养 4 h 不可溶性蛋白的表达 Insoluble protein of pET-*PlxyOr83b* without induction by IPTG.

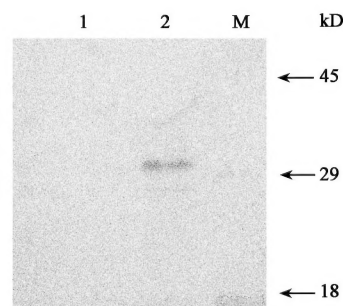


图8 融合蛋白质 Or83b 的 Western-blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of Or83b fusion protein

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: pET-32a(+) 的 Western blot 分析 Western blot of pET-32a(+); 2: pET-*PlxyOr83b* 的 Western blot 分析 Western blot of pET-*PlxyOr83b*.

### 3 结论与讨论

气味受体蛋白是昆虫嗅觉系统中识别化学信号分子的重要组成部分。昆虫必需由传统气味受体和非特异的气味受体 Or83b 共同表达形成复合体, 才有具有嗅觉功能, 其中 Or83b 家族受体是昆虫特有的一类非典型的气味受体, 它在不同昆虫间高度保守。本文根据 Or83b 受体在昆虫中的高度保守性设计引物, 克隆得到小菜蛾 Or83b 气味受体基因 *PlxyOr83b*, 构建了该基因的原核表达载体, 并在大肠杆菌 DE3 中获得正确表达。进一步分析 *PlxyOr83b* 表明, 小菜蛾、果蝇等昆虫的 Or83b 在分子结构上与哺乳动物 Or83b 差别很大, 虽然两者序列中皆含有 7 个跨膜区, 但昆虫 Or83b 的 N 末端在膜内, 没有 G 蛋白偶联受体的典型结构 (Benton *et al.*, 2006), 而哺乳动物气味受体的 N 末端位于膜外, C 末端位于

膜内,具有 G 蛋白偶联受体的结构特征,甚至是一种反向的 G 蛋白偶联受体结构(Su *et al.*, 2009)。事实上,从昆虫 Or83b 蛋白与人、鼠等高等哺乳动物的 Or83b 序列比对可知,两者的相似性仅 1% 左右。这可能是昆虫 Or83b 与典型的 G 蛋白偶联受体进化起源不同所致,这也可能是导致昆虫与哺乳动物嗅觉感受机制差别很大的主要原因。研究表明昆虫的嗅觉机制不同于其他动物,昆虫能更快地把气味信息传至大脑,即使 G-蛋白信号途径中的一些蛋白质失效,昆虫的离子通道也未受影响,这说明昆虫并不通过 G-蛋白信号途径传导嗅觉信息(Sato *et al.*, 2008),至少不是主要信号转导途径。昆虫嗅觉使用的离子通道是由 2 种蛋白质组成的复合体,与传统气味受体不同,每种昆虫的 Or83b 家族受体只有一种,而传统的气味受体则多达几十种,并且 Or83b 家族受体在大部分嗅觉神经元中与传统气味受体共同表达,而传统气味受体只在嗅觉神经元中选择表达。

植食性昆虫主要把气味作为搜寻寄主植物的导向因子,十字花科蔬菜所发出的挥发性气味物质对小菜蛾具有引诱作用。为有效防治小菜蛾,非常值得深入研究其嗅觉感受机制。气味受体对化合物的高度敏感性和选择性已成为近期研究的热点(Misawa *et al.*, 2010)。关于 PlxyOr83b 与小菜蛾其他气味受体的互作及其对寄主植物信息物质的感受机制目前正在研究之中。本文在原核细胞中表达了小菜蛾 or83b 重组蛋白,目的是开发昆虫行为调节剂提供基础。下一步研究将根据其重组蛋白进行功能分析,从分子水平出发以小菜蛾嗅觉受体 Or83b 为靶标,深入研究小菜蛾 Or83b 的结构,及其与不同抑制剂相互作用的机理,也可以筛选受体的高效抑制剂,为合理选用高效杀虫剂,设计能够明显降低甚至使小菜蛾丧失搜寻寄主能力的行为调节剂、综合防治新技术提供参考(Jorgensen *et al.*, 2004; Amaro *et al.*, 2008)。

## 参 考 文 献 (References)

- Amaro RE, Baron R, McCammon JA, 2008. An improved relaxed complex scheme for receptor flexibility in computer-aided drug design. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 22(9): 693–705.
- Benton R, 2006. On the origin of smell: odorant receptors in insects. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1579–1585.
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol.*, 4(2): 240–257.
- Carey AF, Wang GR, Su CY, Zwiebel LJ, Carlson JR, 2010. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*, 464(7285): 66–72.
- Ditzen M, Pellegrino M, Vosshall LB, 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*, 319: 1838–1842.
- Dobritsa AA, van der Goes van Naters W, Warr CG, Steinbrecht RA, Carlson JR, 2003. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 37(5): 827–841.
- Jones WD, Nguyen TT, Kloss B, Lee KJ, Vosshall LB, 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr. Biol.*, 15(4): R119–121.
- Jorgensen WL, 2004. The many roles of computation in drug discovery. *Science*, 303: 1813–1818.
- Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A*, 189(7): 519–526.
- Krieger J, Raming K, Dewer YM, Bette S, Conzelmann S, Breer H, 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neurosci.*, 16(4): 619–628.
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703–714.
- Misawa N, Mitsuno H, Kanzaki R, Takeuchi S, 2010. Highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(35): 15340–15344.
- Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K, 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307(5715): 1638–1642.
- Pitts RJ, Fox AN, Zwiebel LJ, 2004. A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14): 5058–5063.
- Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(47): 16653–16658.
- Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K, 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190): 1002–1006.
- Song HG, Kwon JY, Han HS, Bae YC, Moon C, 2008. First contact to odors: our current knowledge about odorant receptors. *Sensors*, 8(10): 6303–6320.
- Su CY, Menzies K, Carlson JR, 2009. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell*, 139(1): 45–59.
- Vosshall L, Wong A, Axel R, 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102(2): 147–159.
- Wang GR, Wu KM, Su HH, Guo YY, 2005. Gene cloning and tissue-specific expression of an olfactory receptor in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 48(6): 823–828. [王桂荣, 吴孔明, 苏宏华, 郭予元, 2005. 棉铃虫嗅觉受体基因的克隆及组织特异性表达. 昆虫学报, 48(6): 823–828]
- Xia Y, Zwiebel LJ, 2006. Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile virus mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(3): 169–176.

(责任编辑: 赵利辉)